

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 05227925
PUBLICATION DATE : 07-09-93

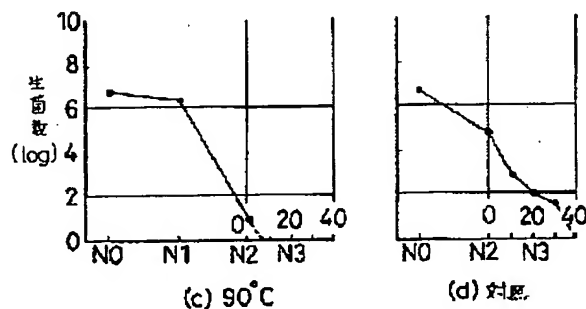
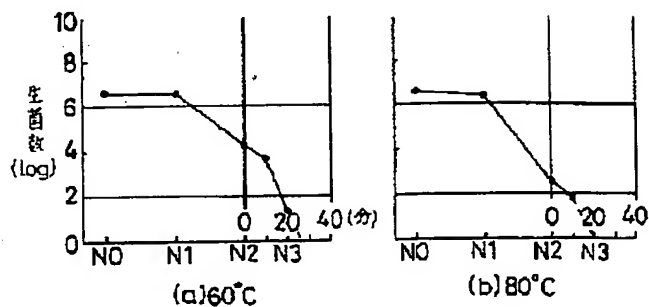
APPLICATION DATE : 20-09-91
APPLICATION NUMBER : 03241775

APPLICANT : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD;

INVENTOR : SHIBAUCHI YOSHITO;

INT.CL. : A23L 3/015 A23L 1/01 A23L 2/02

TITLE : METHOD FOR STERILIZATION



ABSTRACT : PURPOSE: To effectively sterilize at relatively low pressures such bacterial spores of esp. high pressure and heat resistance as to have been hard to make high- pressure sterilization, without impairing the ingredients and flavor of a food to be sterilized.

CONSTITUTION: According to the pressure resistance of spores, the spores in a food to be sterilized is put to germination heat activation at 60-100°C followed by high pressure treatment at ≥ 100 MPa.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-227925

(43) 公開日 平成5年(1993)9月7日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 L 3/015		2114-4B		
1/01	Z	8214-4B		
2/02	Z	9162-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平3-241775

(22) 出願日 平成3年(1991)9月20日

(71) 出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(72) 発明者 舟橋 治幸

埼玉県川越市新宿町5丁目11番3号 雪印
乳業株式会社技術研究所独身寮

(72) 発明者 柴内 好人

埼玉県狭山市狭山台2丁目1-2-13-
302

(74) 代理人 弁理士 若林 忠

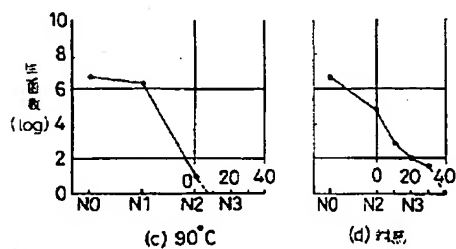
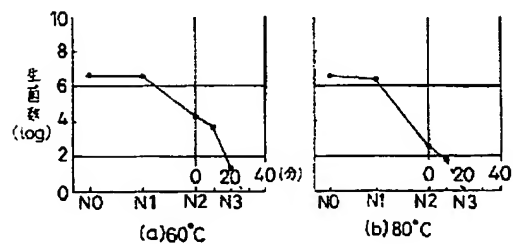
(54) 【発明の名称】 殺菌方法

(57) 【要約】

【目的】 高压処理単独の操作では死滅しない芽胞の殺菌及び高压処理条件の緩和。

【構成】 芽胞の耐圧性に応じ加熱処理温度60-100℃で被殺菌物中の芽胞を発芽熱活性化処理した後、高压処理する。

B subtilis ATCC 6633
[400MPa, Buffer]



【特許請求の範囲】

【請求項1】 被殺菌物中の細菌芽胞を加熱により発芽活性化処理し、つづいて高圧処理することを特徴とする細菌芽胞の殺菌方法。

【請求項2】 加熱による発芽活性化処理が40℃以上で1分間以上であり、高圧処理における加圧圧力が100MPa以上である請求項1に記載の殺菌方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、食品又は医薬品等で衛生上又は品質保持上問題となり得る細菌芽胞を殺菌する方法に関する。本技術は特に、耐熱性、耐圧性の高い細菌芽胞の殺菌に適用できる。

【0002】

【従来の技術】食品や医薬品の腐敗や病原性微生物の汚染は公衆衛生上問題となるため、従来より加熱殺菌等による微生物コントロールが広く食品産業、医療業等の分野で実施されている。食品あるいは医薬中に付着する細菌の種類はその種類により若干異なるが、いろいろな菌が空気や水を介して付着する可能性がある。殺菌の観点からすれば、病原性の細菌、グラム陰性菌、および酵母菌等は一般に熱に弱く通常の加熱殺菌で処理できコントロールし易いが、グラム陽性菌やカビ類、特に胞子を形成するものは耐熱性が強く、加熱殺菌で容易に死滅しないので問題である。例えば、グラム陽性菌である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) ではその菌株によって異なるが、100℃で数分から1000分以上という耐熱性を示す。

【0003】しかし、加熱殺菌では、殺菌と同時にたん白質、ビタミン等の成分変化、風味の変化を招くため、食品等の種類によっては実施が適当でない場合が少なくない。牛乳を例にとれば、現在、UHT殺菌法、UHT滅菌法、低温殺菌法、HTST殺菌法等が採用されている。UHT殺菌法(120～130℃、2～4秒)では牛乳中の栄養細胞、耐熱性菌、耐熱性菌の芽胞の一部を死滅させ、また、UHT滅菌法(135～150℃、2～4秒)では耐熱性菌の芽胞を含む全ての微生物を死滅させることができるが、成分変化、風味変化が避けられない。又、低温殺菌法(62～65℃、30分)、HTST殺菌法(72～85℃、16秒)では成分、風味の変化が少なく牛乳本来の風味が維持されるが、耐熱性菌及び耐熱性菌の芽胞を十分に殺菌できないため長期保存ができない。

【0004】そこで、近年注目されているのが高圧殺菌法である。例えば、清涼飲料の高圧殺菌では大腸菌、カビ、酵母、のような栄養細胞は室温で300～600MPa保持時間10分で殺菌できるという報告(高橋保男ら、果汁協会報Vol 370 pp6-13, 1988)や、更に高圧殺菌に加熱処理を併用すると殺菌効果が向上するという報告(高橋保男ら、果汁協会報Vol 381 pp41-46, 1989)が

ある。又、*B. subtilis*の殺菌に関してもこれらの報告中で4,000kg/cm²(約400MPa)、10分処理の静水圧により、*B. subtilis*以外の菌は、すべて死滅し、47℃および57℃の加熱処理、6,000kg/cm²(約600MPa)、10分間の静水圧処理の併用で、*B. subtilis*は死滅したと報告されている。

【0005】しかし、本発明者らの試験によれば耐熱性、耐圧性の高い*B. subtilis*の芽胞は、600MPa～60℃で60分保持しても完全に芽胞は死滅しない場合があった。これは、一般に耐熱性、耐圧性の強い*B. subtilis*には種々の菌株があり、その中には特に耐性の強い菌株もあり、又、被処理物の種類により菌の耐性が変わってくるという事実と、ジュース類のようなpHの低い食品(一般にpH4.6以下の食品を高酸性食品と呼んでいる)ではこれらの芽胞が発芽増殖しないということに起因している。即ち、従来実施されている高圧殺菌は一般に大腸菌、カビ、酵母のように耐圧性の低い微生物を対象としているが、牛乳やスープ類のような多くの低酸性食品(pH≧4.6)では長期保存を実現するには耐熱性の高い細菌芽胞を指標菌とすべき場合がある一方で、このような耐性の強い芽胞の高圧による殺菌は困難であった。また、これら芽胞は温度ばかりでなく圧力に対しても耐性をもっているため高圧処理条件が苛酷となりやすい。このため、高圧殺菌においては食品の成分、香りが変化しないよう細菌芽胞をより低い圧力で死滅させる技術開発が課題となっている。

【0006】一方、高圧殺菌を行なう装置は三菱重工(株)、神戸製鋼(株)などで開発され工業化が進み、試験機としては1000MPa程度まで可能であるが、食品処理専用の生産機としては安全性、装置の耐久性などを考慮すると400～500MPaでの運転が適しているといわれている。しかしながら、400～500MPaの圧力では大腸菌、カビ、酵母、ブドウ球菌を殺菌することはできるが、耐熱性、耐圧性の高い細菌芽胞を殺菌することは60℃の加温を併用してもできない場合がある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上述した従来の高圧殺菌技術の実情に鑑み、特に耐圧性、耐熱性が高く高圧殺菌が困難であった細菌芽胞を、被殺菌物の成分、風味を損うことなく有効に殺菌する方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】かかる目的は、以下の手段により達成される。即ち、本発明は、被殺菌物中の細菌芽胞を加熱による発芽活性化(以下発芽活性化という)処理し、つづいて速やかに高圧処理することを特徴とする細菌芽胞の殺菌方法である。本発明者らは、細菌芽胞は、加熱されると発芽活性化され、耐熱性、耐圧性が弱まることに着目し、高圧処理する前に一定の加熱処

理を施すことによって400~500MPa程度の圧力で細菌芽胞等を殺菌できることを見出し本発明に至った。本発明によれば従来高压殺菌が困難であった細菌芽胞を被殺菌物の成分変化等の弊害を招くことなく有効に殺菌することができ、又、従来高压殺菌が可能であったものに対しては高压処理条件の緩和を図ることができ、この結果、食品や医薬品の品質を高め、同時にシェルフライフを伸ばすことが可能となる。

【0009】以下、本発明を詳述する。まず、本発明において対象となる被殺菌物としては、耐熱性、耐圧性の高い芽胞による汚染の可能性があり、高压処理が可能な食品、医薬品等、その形態、形状等を問わずいずれも対象となる。もちろん、上記の高压処理条件の緩和が目的なら、それほど耐圧性の高くない芽胞に対しても本法は有効である。高压処理の容易さという観点からは、各種ジュース、清涼飲料、牛乳等の液体、各種スープ、ソース類、果実ジャム、魚介類・肉類ペースト、卵等の流動体や半流動体が好ましい。さらに、固形物であっても液体中に浸漬あるいは分散していれば処理できる。又、細菌芽胞による汚染の可能性と易加熱処理という観点からは、牛乳、各種スープ類のような低酸性食品に実益がある。

【0010】次に、対象となる細菌芽胞としては、*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. coagulans* 等、全ての芽胞形成菌の芽胞である。本発明の目的からすれば、従来の高压殺菌では殺菌、滅菌に極めて大きな圧力が必要であったり、又、充分な殺菌が実用上できなかった菌株の芽胞を対象とすると有益である。例えば*B. subtilis*は比較的耐熱性、耐圧性の低い菌株もあれば耐熱性、耐圧性の高い菌株もあり、前者は従来の加熱処理を併用した高压殺菌により有効に殺菌が可能であるが、後者はこのような高压殺菌でも死滅しない。

【0011】本発明の殺菌方法の第1のステップは細菌芽胞の発芽熱活性化処理である。発芽熱活性化とは、発芽が熱の影響を受けて発芽が惹起され発芽状態になることをいい、現象的には芽胞の外膜が徐々に溶んできて(後述する Optical densityの低下)栄養細胞化への準備段階に入ること、一般的に耐熱性の低下が見られる。発芽熱活性化した芽胞は徐々に栄養分や酵素吸収等の活動を開始するが、本発明では芽胞が発芽を開始する直前までの処理で足りる。本発明における発芽熱活性化の目的は、芽胞の外膜の持つ耐熱性、耐圧性を低下させ、つづく高压処理での殺菌を可能とすることである。又、全ての芽胞が発芽熱活性化される必要はなく、高压処理の条件、目的とする殺菌程度、対象とする芽胞の種類、被殺菌物の種類等により適宜設定する。但し、発芽熱活性化の程度は高压処理における殺菌効果に対し、臨界的に作用するので、他の条件との兼ね合いで適正な程度とする必要がある。

【0012】発芽熱活性化処理は、芽胞の活性化臨界温

度以上で高压処理での殺菌促進効果を奏する臨界時間(これを活性化臨界条件という。)実施する。活性化臨界条件は芽胞の種類、環境条件等により個別的に決定されるが、臨界温度未満では、いくら長時間処理しても効果が現れず、同様に臨界時間未満では、温度が高くても効果が現れない。一般的には40℃以上、好ましくは60-100℃の温度で、1分以上、好ましくは5-60分間がよい。この範囲で、処理温度が高くなれば保持時間は短かくてすむ。又、温度が高ければ活性化速度は処理開始後5~10分間位が大ききその後低下してくるので高い温度によれば活性化処理の効率化が図れるが、温度が高すぎれば芽胞は活性化されない。耐熱性が比較的低い芽胞では活性化処理中に一部死滅する場合もあるが、活性化処理の目的は殺菌ではないので、この段階で温度を必要以上に高くしても有効ではなく、通常は芽胞の耐熱性のため、殺菌効果もあまり認められない。一方、保持時間が長すぎた場合は、芽胞は発芽し酸素吸収等の活動を開始し、場合により、被殺菌物の腐敗を促進する結果となる。又、比較的低温で長時間保持しても芽胞は活性化されるが、この場合も他の微生物等による腐敗が起り得る。

【0013】活性化処理の程度は高压処理条件との関係において殺菌効果に大きく影響する。活性化処理の程度による殺菌効果の態様には高压処理の圧力が未活性化処理のものと同じとした場合、大別して3つある。第1には、高压処理初期において生菌数減少の勾配が大ききその後はなだらかとなり最終的生菌数は未活性化処理のものほとんど変わらないものである。(図1(A))。これは、活性化処理により芽胞のうち比較的耐性が弱いもののみが活性化し、強いものは活性化しなかったために、強い芽胞が最後まで残ることによる。この場合は、高压処理の時間を短縮しても同様の殺菌効果が得られる利点がある。第2には、高压処理初期の生菌数減少の勾配は比較的大きく、その後は、未活性化処理と同様の勾配で減少していくものである(図1(B))。これは、芽胞のうち耐性の弱いもの程活性化が進み、耐性の強いものもある程度活性化することによる。この場合は、高压処理の時間を短縮しても同様の殺菌効果が得られ、又、同じ時間高压処理をした場合はより大きい殺菌効果が得られる利点がある。第3には、高压処理初期から最後まで生菌数減少の勾配が大ききものである(図1(C))。これは、耐性の強い芽胞も含め多くの芽胞が活性化したことによる。この場合は、高压処理時間の短縮化ばかりでなく、従来高压処理による殺菌が困難であった芽胞の殺菌が可能となる利点がある。上記態様(A)-(C)の共通の利点としてはいずれにおいても、高压処理の圧力を低くしても未活性化処理のものと同等もしくはそれ以上の殺菌効果が得られることである。このように、活性化処理の程度は殺菌効果に関連しているため、目的とする殺菌程度、高压処理条件、対象

芽胞、被殺菌物等との関連で相対的に設定すればよい。例えば、比較的耐性の弱い芽胞を殺菌する場合は高压処理のみでも殺菌効果が得られるので態様(A)となるよう比較的弱い活性化処理を実施し、高压処理時間の短縮化、圧力の軽減化を図ることができる。一方、比較的耐性の強い芽胞を殺菌する場合は高压処理のみでは殺菌効果が得られないので態様(C)となるよう比較的強い活性化処理を実施し、目的とする殺菌効果を達成すること*

*ができる。

【0014】活性化処理の強弱の一つの指標となり得るものには芽胞の光学的密度(Optical Density; 以下ODという)の低下がある。ここでODは芽胞懸濁液の可視光(ここでは波長440nmの光を使用)に対する吸光度と定義されるが、以下の発芽熱活性化処理においては、

$$\text{相対OD [\%]} = \frac{\text{測定したOD} - \text{最終OD}}{\text{初期OD} - \text{最終OD}} \times 100$$

で定義した相対ODを用いて説明する。ここで測定したODとは、発芽熱活性化中のある時間におけるODの観測値、初期ODは活性化処理していない芽胞懸濁液のOD値、そして最終ODは懸濁液中の芽胞が全て発芽活性化した時のOD値である。B. subtilisを例にとれば、比較的耐性の弱いものでは活性化処理も弱くてすむので、相対ODの4-6%程度の減少でも高压処理で殺菌効果を向上させ得る。比較的耐性の強いものでは15-20%程度減少するまで活性化を図ると効果が大きい。図2、3に相対ODの実測例として、B. subtilis ATCC 6633とB. subtilis NCD0 2130の場合を示す。図に見るように相対ODの低下の大きさは処理時間に比例しているとはかぎらないが、活性化処理程度の目安としては耐性の弱い芽胞で4-56%程度の低下、耐性の強い芽胞で15-50%程度の低下である。

【0015】尚、活性化は熱の他、例えば還元物質、エチルアルコール、アミノ酸、糖等の存在、pH等によっても促進され得るので、必要によりpHを調整したり、エチルアルコール、アミノ酸、糖等を添加して加熱処理してもよい。

【0016】次に、高压処理について説明する。活性化した、細菌芽胞は保存条件によって発芽増殖したり、また再び非活性化したりする。したがって高压処理は活性化処理の後、速やかに実施することが望ましい。高压処理の条件を取りうる範囲で示せば、従来の高压範囲での範囲と大きく相違していない。即ち、100-1000MPa、室温-100℃、数時間以内程度がとりうる範囲といえる。しかし、これは範囲であって、従来技術において例えば100MPa、室温、数分で芽胞の殺菌が実施可能であることを意味していない。即ち、圧力が低ければ、温度を高くするか処理時間を長くすることが不可欠であり、上記範囲内で任意に条件を設定できるわけではない。

【0017】本発明の高压処理における特徴は、まず上記範囲内で従来高処理殺菌できなかった芽胞を本発明では同範囲内で充分殺菌できること、次に、従来ある条件下で高压殺菌できた芽胞を本発明ではさらに緩和な加圧条件下で殺菌ができることである。後者の特徴は、例えば、次のように規定できる。同等の殺菌効果を得るのに、他

の条件は同じとして、高压処理時間は1/2-1/5程度まで、又、圧力は1/2-1/3程度まで短縮することが可能である。前記高压処理の範囲はとり得る範囲であるが、本発明において実用性を考慮すれば、40℃以上、好ましくは50-60℃で100MPa以上、好ましくは400-700MPaで0-60分程度がよい。処理時間が0分をとり得るのは、活性化処理で芽胞が脆弱化しており所定圧力になるまでの昇圧段階で、芽胞が死滅する場合があるからである。

【0018】一方、運転の安全性高压装置の耐久性、被殺菌物の内容成分の変化等の見地から圧力は500-600MPaが実際の運転上の好ましい上限と考えられるが、従来、この程度の圧力では加温しても又、保持時間を長くしても殺菌できなかった芽胞の殺菌が可能となる。

【0019】高压処理の温度が高いと高压による効果を促進することができる。温度が低い場合は高压の効果が低減するが、耐圧性の比較的弱い芽胞を処理する場合では活性化処理によりさらに耐圧性が低下するため、場合により室温でもよい。一方、温度が高い場合は殺菌効果は向上するので温度の上限は特に限定されない。但し、市販されている高压処理装置の構造上の制約から前記範囲程度となる。又、高压処理を上昇温度下で実施するのは効果的であり、逆に、高压処理開始時に高温とし、その後は下降温度下で実施してもよい。

【0020】所定圧力までの昇圧速度は速い方がよいが、特に限定されない。目安としては20-150MPa/min程度で例えば処理量の変化で調整できる。昇圧中に耐圧性の弱い芽胞は死滅する場合があるが、耐圧性の強い芽胞では全く変化しない場合もある。しかし、活性化処理の程度を強くすることで昇圧時のみで充分な殺菌効果を得ることが可能で、これは従来技術では全くみられない本発明に特有な効果である。換言すれば、細菌芽胞の種類によっては、活性化処理の程度を調整することで、昇圧時のみで所望の程度まで殺菌を実施することもできるのである。

【0021】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明する。

1. 実施方法

(1) 供試菌

供試菌として*Bacillus*属の芽胞の中でも比較的耐熱性、耐圧性の低い*Bacillus subtilis* ATCC 6633と耐熱性、耐圧性の高い*Bacillus subtilis* NCD0 2130 の2菌種を用いた。

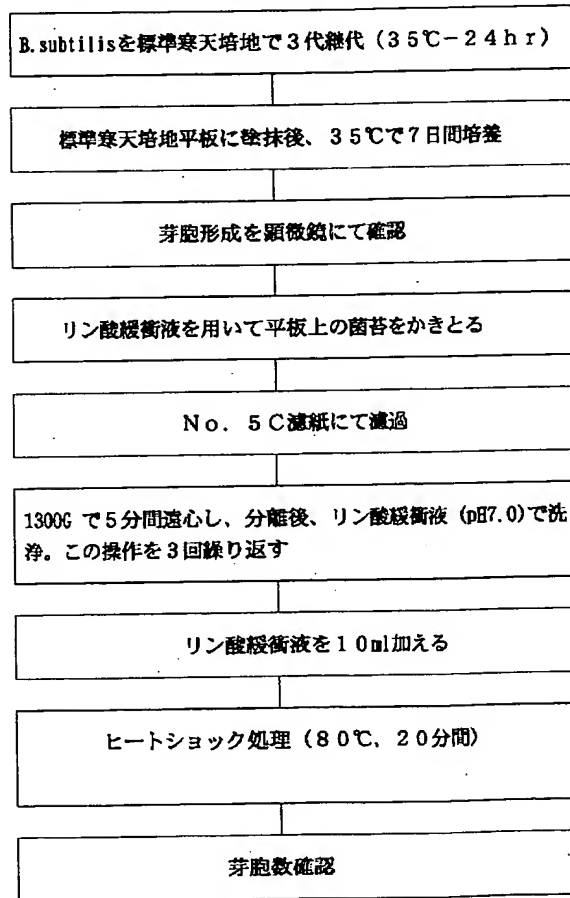
【0022】(2) 供試菌液の調製

実験にはリン酸緩衝液と雪印乳業(株)製、雪印3.5牛乳(無脂乳固形分8.3%以上、乳脂肪分3.5%以上)を使用した。各濃厚菌混濁液を用い、リン酸緩衝液×10

*および牛乳中に供試菌数が 10^6 個/mlになるように希釈して調製した。リン酸緩衝液はリン酸緩衝液-生理食塩水(pH7.0)である。pHの調整は水酸化ナトリウムおよび塩酸を用いて行った。また、牛乳のpH調整は行わなかったが、約6.8であった。*B. subtilis* ATCC 6633および*B. subtilis* NCD02130の芽胞についての調製法は表1に示した。

【0023】

【表1】

表1 *B. subtilis*芽胞菌液の調製フロー

(3) 活性化処理および高圧処理

リン酸緩衝液および牛乳を用いて調製された菌液を10mlずつポリプロピレン製袋に分注し、空気が入らないように充填し、口をヒートシールし、試料とした。試料は活性化処理および高圧処理時以外は常時氷水中で保存した。活性化処理は恒温槽中で*B. subtilis* ATCC 6633の場合、60℃、80℃、90℃で15分間、*B. subtilis* NCD0 2130の場合、80℃、90℃、100℃で15分間行った。

【0024】高圧処理には三菱重工業(株)製の高圧試

験装置MCT150を使用した。試料チャンバーの容量は*B. subtilis* ATCC 6633の場合、5301.4cm³、*B. subtilis* NCD0 2130の場合、196.4cm³とした。高圧処理する際に60℃の加温を併用したが、恒温槽中の温水を循環することにより試料チャンバーの温度調整を行った。

【0025】(4) 生菌数の測定

供試菌液を活性化処理し、その後、試料を高圧処理した。活性化処理後、昇圧後、および高圧処理後の生菌数を測定した。*B. subtilis*の場合、滅菌リン酸緩衝生理食

塩水で希釈後、標準寒天培地を用い、35℃で48時間培養した後、生育したコロニー数を計数した。

2. 実施結果

結果を図4～図11にまとめて示す。

【0026】(1) 活性化処理時の芽胞の死滅

B. subtilis ATCC 6633を温度60～90℃で15分間加熱し、処理後の生菌数を測定した。図4及び6にリン酸緩衝液中、図5及び7に牛乳中における芽胞の死滅を示した。初期生菌数(N0)と活性化処理後の生菌数(N1)を比較すると1オーダー近い差がみられた場合もあったが、繰り返し実験を行ったところ加熱によりリン酸緩衝液、牛乳中とも大きな差異はみられなかった。通常、60～90℃で15分間の加温では芽胞は死滅しにくい、保存や菌液調製時の菌の状態により活性化処理後の生菌数(N1)は多少変化する可能性もあると考えられる。次にB. subtilis NCD0 2130を温度80～100℃で15分間加熱処理し、処理後の生菌数(N1)を測定した。図8及び10にリン酸緩衝液中、図9及び11に牛乳中における加熱による芽胞の死滅を示した。B. subtilis ATCC 6633同様、初期生菌数(N0)と差はなく、加熱による殺菌効果はみられなかった。因に、加熱殺菌実験により算出された110℃におけるB. subtilis NCD0 2130のD値は63.4分であり、又温度80～100℃で15分間加熱処理しても芽胞は死滅しなかった(D値とは生菌数が1/10になるまでの処理時間をいう。)

【0027】尚、上記活性化処理の処理時間は15分間であるが活性化処理時間による芽胞の相対ODの低下を計測した結果を前述した図2(B. subtilis ATCC 6633)、図3(B. subtilis NCD0 2130)より見ると、いずれの菌株においても活性化処理の温度が高い程、透明性の変化が速く、透明度が高くなる傾向にあり、またいずれの温度においても透明性は増しており活性化されていると認められた。

【0028】(2) 昇圧時の芽胞の死滅に及ぼす活性化処理の効果

B. subtilis ATCC 6633を高圧処理する時、200MPa、400MPaの圧力に到達するまでそれぞれ9分30秒、17分30秒の昇圧時間を要した。B. subtilis ATCC 6633はB. subtilis NCD0 2130にくらべ耐熱性、耐圧性ともに低いの、60、80、90℃で15分間加熱前処理し、その後、200MPa、400MPaの圧力で処理した。図4及び6にリン酸緩衝液中における芽胞の死滅を図5及び7に牛乳中における芽胞の死滅活性化を示した。活性化処理後の生菌数はN1、昇圧後の生菌数はN2である(尚、便宜上、図中横軸にN1、N2等の記号を記しているが、これは縦軸の生菌数との対応を示している。)。活性化処理しない場合には昇圧時にリン酸緩衝液中および牛乳中ともに200MPaで1オーダー、400MPaで2オーダーの芽胞が死滅したが、

リン酸緩衝液、牛乳とも、活性化処理温度が60℃→80℃→90℃と高くなるに従い、N2の減少が大きくなった。特に400MPaでは活性化処理の効果が顕著であり80℃の活性化処理で4オーダー、90℃で5オーダーも減少し、昇圧時だけで充分殺菌が実施できた。この結果から、耐圧性が比較的低い芽胞は昇圧時のみで殺菌することも可能であることが判る。尚、60℃-15分の活性化処理をした場合、処理しなかった場合と比較して差はみられなかったが、これよりも耐熱性、耐圧性の弱い芽胞を対象とすれば、差が現れたものと考えられる。

【0029】次に、B. subtilis NCD0 2130の場合は、400MPa、600MPaの圧力に到達するまでそれぞれ5分30秒、6分30秒の昇圧時間を必要とした。80、90、100℃で15分間加熱処理し、その後、400MPa、600MPaの高圧処理を行った。図8及び10にリン酸緩衝液中の芽胞の死滅、図9及び11に牛乳中の芽胞の死滅を示した。リン酸緩衝液中では400MPa、600MPaともに80～100℃の温度範囲で15分間の処理をしても活性化処理なしと差はなかったが、牛乳中では600MPaまでの昇圧時に90℃以上の加熱前処理により1オーダー近い殺菌効果がみられた。

【0030】一般に耐熱性と耐圧性は相関が高く、B. subtilis ATCC 6633はB. subtilis NCD0 2130に比べ、耐熱性が低く、耐圧性も低い、B. subtilis ATCC 6633は発芽活性化されやすく、発芽活性化された芽胞は元の芽胞に比べ耐圧性が低かったために低い圧力でも殺菌効果が高かったと考えられる。一方、B. subtilis NCD0 2130は一部発芽活性化されているが、耐圧性が高いため昇圧時だけでは死滅まで到らなかった。しかし、活性化処理をさらに強く行うことにより、昇圧時で充分な殺菌効果を得ることも可能である。

【0031】(3) 圧力保持時(60℃加温)の芽胞の死滅に及ぼす加熱前処理の効果

定めた圧力に到達した時を保持時間0分とし(N2)、圧力保持後の生菌数を計測した(N3)。図4及び6に示すようにB. subtilis ATCC 6633はリン酸緩衝液中で、保持時間が長くなるにしたがい殺菌効果も高まる傾向がみられたが、この傾向は活性化処理の有無であまり相違がなかった。これはB. subtilis ATCC 6633芽胞が活性化処理により発芽活性化され、耐性が弱まったものは昇圧時にすでに死滅し、発芽活性化されずに元の状態に近い耐圧性の高い芽胞のみが残存したため圧力保持時の生菌数減少が小さくなったためである。換言すれば、昇圧時にすでに活性化処理による殺菌効果が顕在化するため、保持時には顕著でなくなる。

【0032】図5及び7にはB. subtilis ATCC 6633の牛乳中での殺菌効果を示すが、牛乳中でも同様の傾向がみられ、昇圧時に殺菌効果の高かった80℃-15分、9

0℃15分の加熱前処理は圧力保持時には大きな効果は見られなかった。

【0033】因に、各条件におけるN3/N2基準のD値（生菌数が1/10になるまでの時間（分））を示し、殺菌効果の指標となる）を計算したところ該D値の上からは活性化処理の効果は有意でなかった。この理由は前述したようにB. subtilis ATCC 6633の場合、昇圧時に菌の死滅が起っているためである。

【0034】B. subtilis NCD0 2130については図8（400MPa）及び図10（600MPa）にリン酸緩衝液中での殺菌効果を示す。400MPaでは、圧力処理のみ行った場合は保持時間を延長しても殺菌効果が全く認められなかったが、活性化処理を行うことにより保持時間を長くするにつれて殺菌効果が高まるようになった。また、活性化処理温度が高くなるにつれて圧力保持時の殺菌効果が高まった。600MPaでは、圧力処理のみでも40分間の保持で若干の殺菌効果が認められたが1オーダー以下の減少にすぎなかった。一方、活性化処理をしたものは、保持時間ともに確実に殺菌効果が得られ、40分間の保持では2～3オーダーの減少が認められた。このように、昇圧時には死滅しない芽胞も活性化処理を施したものは圧力保持時に死滅させることができる。牛乳中での殺菌効果もほぼ同様で、図9（400MPa）及び図11（600MPa）に示す。しかし、B. subtilis NCD0 2130の場合、昇圧時にも観察されたが、同じ処理条件にもかかわらず、リン酸緩衝液中に比べて牛乳中ではより多くの菌が死滅していた。緩衝液中よりも多くの成分を含む牛乳中の方が発芽活性化され*

* やすいとも考えられるが、前処理なしの場合も含めて殺菌効果が高かったので牛乳中の成分が殺菌に関して何らかの影響を与えていると考えられる。

【0035】表2にはB. subtilis NCD0 2130におけるD値を示す。表2に示す通り、耐圧性の弱いB. subtilis ATCC 6633に比べ保持時の活性化処理効果は著しく、一般に活性化処理の程度が強くなる程D値は減少し、又、圧力が高い方がD値は減少する。但し、600MPa、牛乳のように圧力処理のみで殺菌効果があるものでは活性化処理の効果は顕著でなくなる。これは、昇圧時ですである程度殺菌効果が顕在化するためである。又、リン酸緩衝液では80℃で活性化処理したものの400MPaと600MPaでは、殺菌効果が大きく異なり、同様に、400MPaでは80℃と90℃で大きく異なる。これは80℃での活性化処理においては600MPa付近の圧力が臨界条件的値であり、又、400MPaにおいては90℃付近の温度が臨界条件的値であることを示している。一方、400MPa、80℃においても対照と比べ大幅に殺菌効果は向上し、又、B. subtilis ATCC6633での60℃では圧力に関係なく効果が有意でなかったことから活性化処理の程度と圧力の間には、殺菌効果を向上させ得る第一の臨界条件があり、次に、その効果を大幅に増大させ得る第二の臨界条件があることが判る。これらの条件は、対象とする芽胞の種類、被殺菌物等により設定され得るものである。

【0036】

【表2】

表2 B. subtilis NCD0 2130のD値（単位：分）

溶 液	圧力処理	加熱前処理			
		加熱なし	80℃-15分	90℃-15分	100℃-15分
リン酸緩衝液	200MPa	164.61	49.30	22.36	16.95
	400MPa	72.96	19.53	22.36	17.84
牛 乳	200MPa	40.45	22.36	22.55	17.14
	400MPa	28.41	24.92	26.30	24.51

以上、N0～N3までの生菌数変化を前述殺菌効果の態様の観点から概括的にみると、B. subtilis ATCC 6633の200MPaにおける殺菌効果は態様（A）、400MPaにおけるそれは態様（B）、B. subtilis NCD0 2130の400MPa、600MPaにおけるそれは態様（C）といえることができる。

【0037】

【発明の効果】以上説明したように、高圧処理前に活性

化処理を施すことにより、比較的耐熱性、耐圧性の低い芽胞では（あるいは、耐熱性、耐圧性の高い芽胞でも活性化処理を充分実施することで）昇圧時に殺菌することができ、昇圧時に死滅しない芽胞に対しては、圧力保持時に殺菌することができる。即ち、高圧処理の単独操作だけでは死滅しなかった芽胞の殺菌を可能とし、さらに、高圧処理のみで殺菌が可能であるものに対しては高圧処理条件を緩和にできる技術的意義がある。従って、

本発明の殺菌方法によれば被殺菌物の成分変化を招くことなく耐性の強い芽胞を含め芽胞の殺菌を効率的に実施でき、被殺菌方法は広く食品、医薬品の分野で極めて有用な技術である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の殺菌方法による殺菌効果の態様(A), (B), (C)を示す概念図である。

【図2】*B. subtilis* ATCC 6633の活性化処理中のoptical density 変化を示すグラフである。

【図3】*B. subtilis* NCD0 2130の活性化処理中のoptical density 変化を示すグラフである。

【図4】リン酸緩衝液中の*B. subtilis* ATCC 6633の200 MPa下における生菌数変化を示すグラフである。図中(a)は活性化処理温度が60℃、(b)は同80℃、(c)は同90℃、(d)は対照である。

【図5】牛乳中の*B. subtilis* ATCC 6633の200 MPa下における生菌数変化を示すグラフである。図中(a)は活性化処理温度が60℃、(b)は同80℃、(c)は同90℃、(d)は対照である。

【図6】リン酸緩衝液中の*B. subtilis* ATCC 6633の400 MPa下における生菌数変化を示すグラフである。図中(a)は活性化処理温度が60℃、(b)は同80℃、(c)は同90℃、(d)は対照である。

℃、(c)は同90℃、(d)は対照である。

【図7】牛乳中の*B. subtilis* ATCC 6633の400 MPa下における生菌数変化を示すグラフである。図中(a)は活性化処理温度が60℃、(b)は同80℃、(c)は同90℃、(d)は対照である。

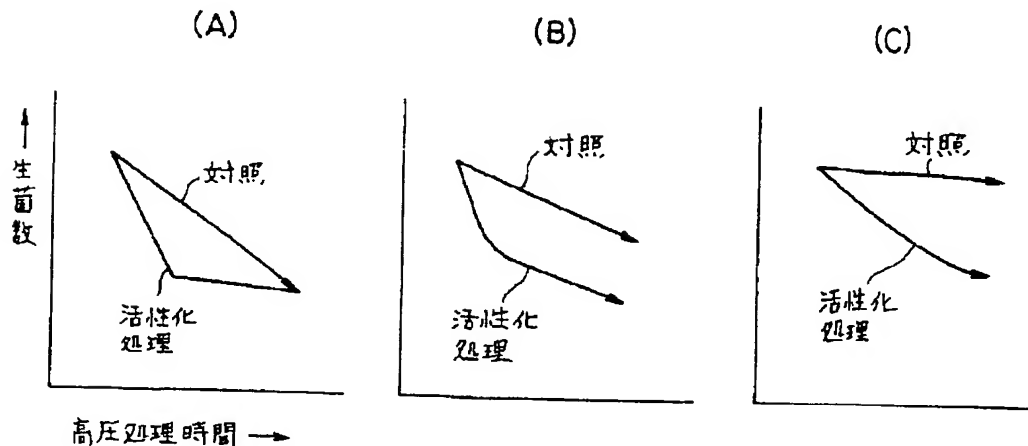
【図8】リン酸緩衝液中の*B. subtilis* NCD0 2130の400 MPa下における生菌数変化を示すグラフである。図中(a)は活性化処理温度が80℃、(b)は同90℃、(c)は同100℃、(d)は対照である。

【図9】牛乳中の*B. subtilis* NCD0 2130の400 MPa下における生菌数変化を示すグラフである。図中(a)は活性化処理温度が80℃、(b)は同90℃、(c)は同100℃、(d)は対照である。

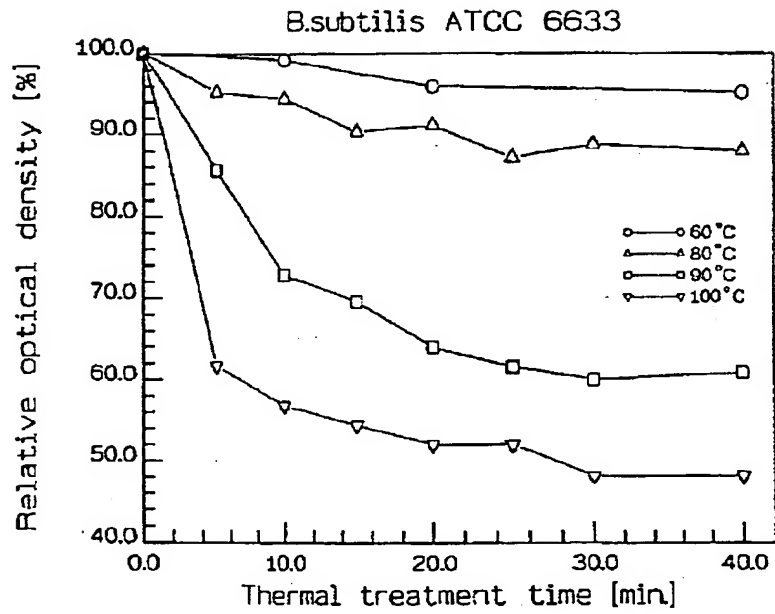
【図10】リン酸緩衝液中の*B. subtilis* NCD0 2130の600 MPa下における生菌数変化を示すグラフである。図中(a)は活性化処理温度が80℃、(b)は同90℃、(c)は同100℃、(d)は対照である。

【図11】牛乳中の*B. subtilis* NCD0 2130の600 MPa下における生菌数変化を示すグラフである。図中(a)は活性化処理温度が80℃、(b)は同90℃、(c)は同100℃、(d)は対照である。

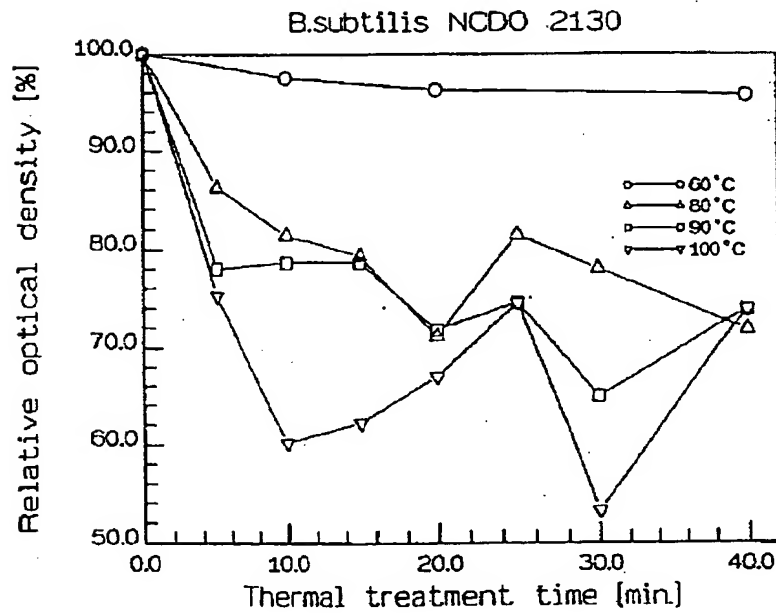
【図1】



【図2】

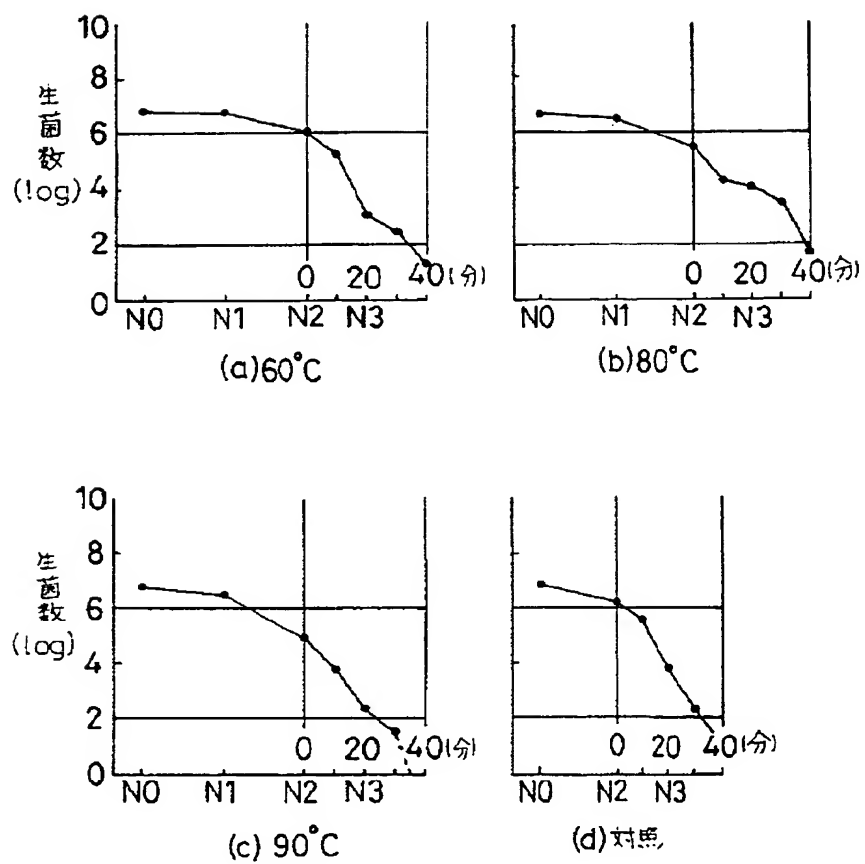


【図3】



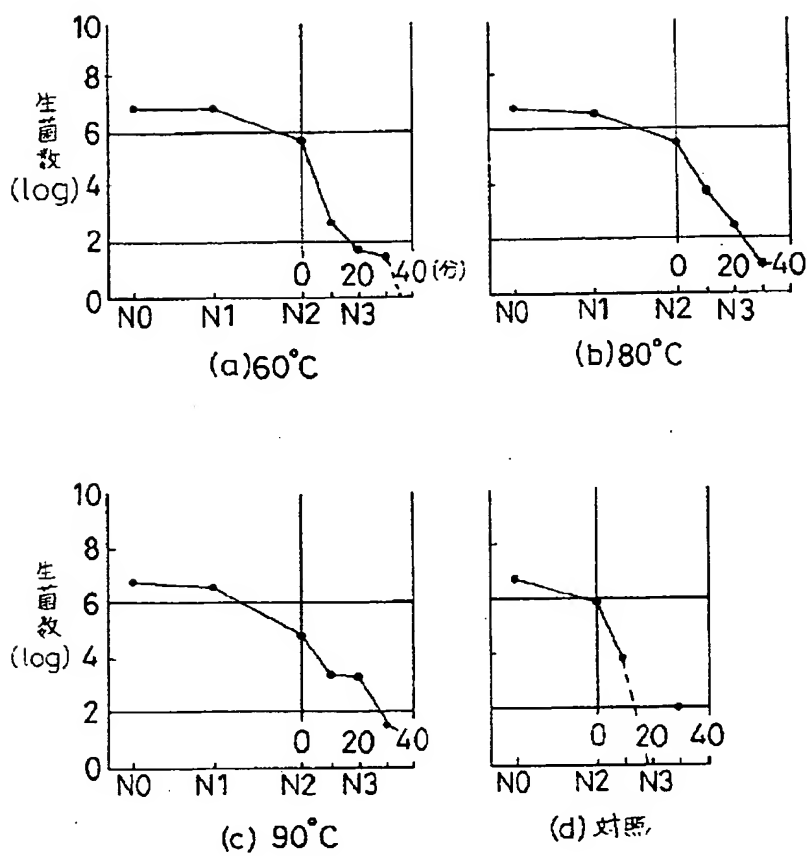
【図4】

B.subtilis ATCC 6633
[200MPa, Buffer]



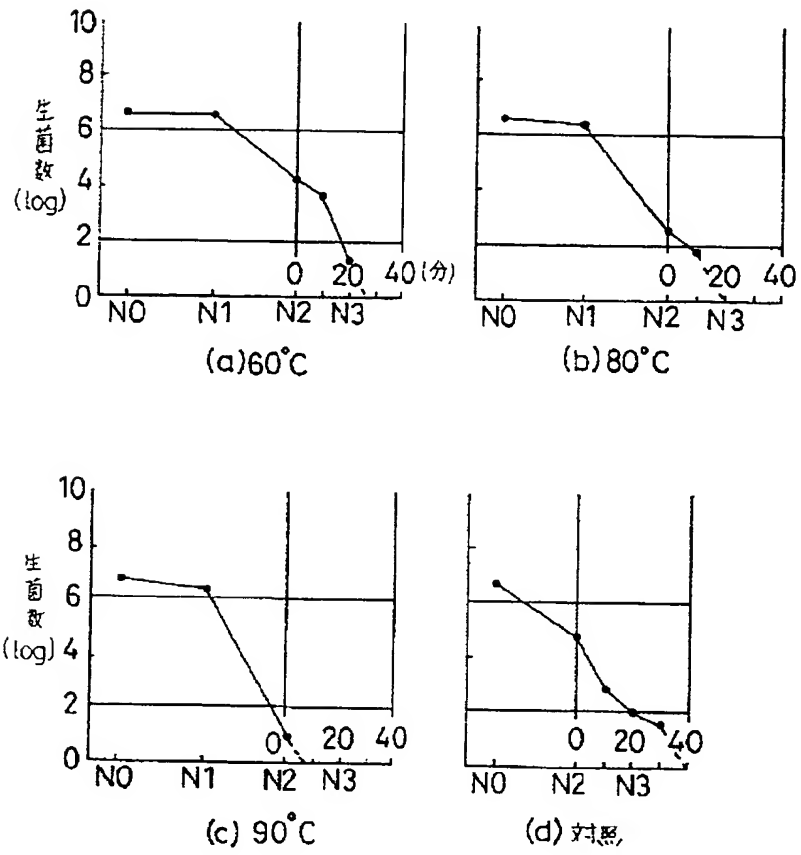
【図5】

B.subtilis ATCC 6633
[200MPa, Milk]



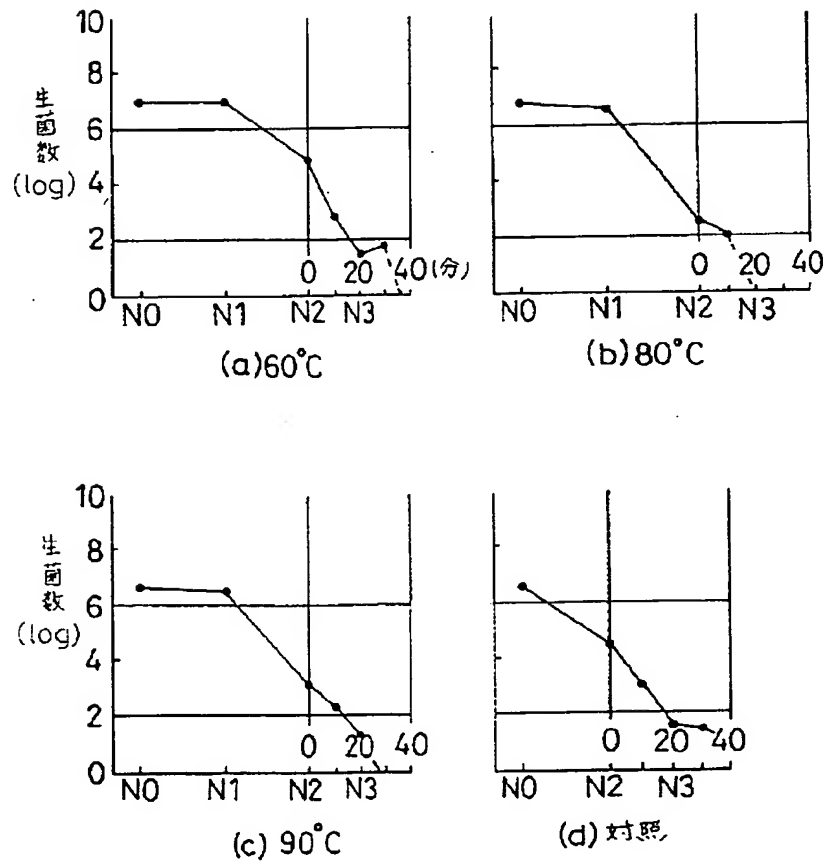
【図6】

B subtilis ATCC 6633
[400MPa, Buffer]



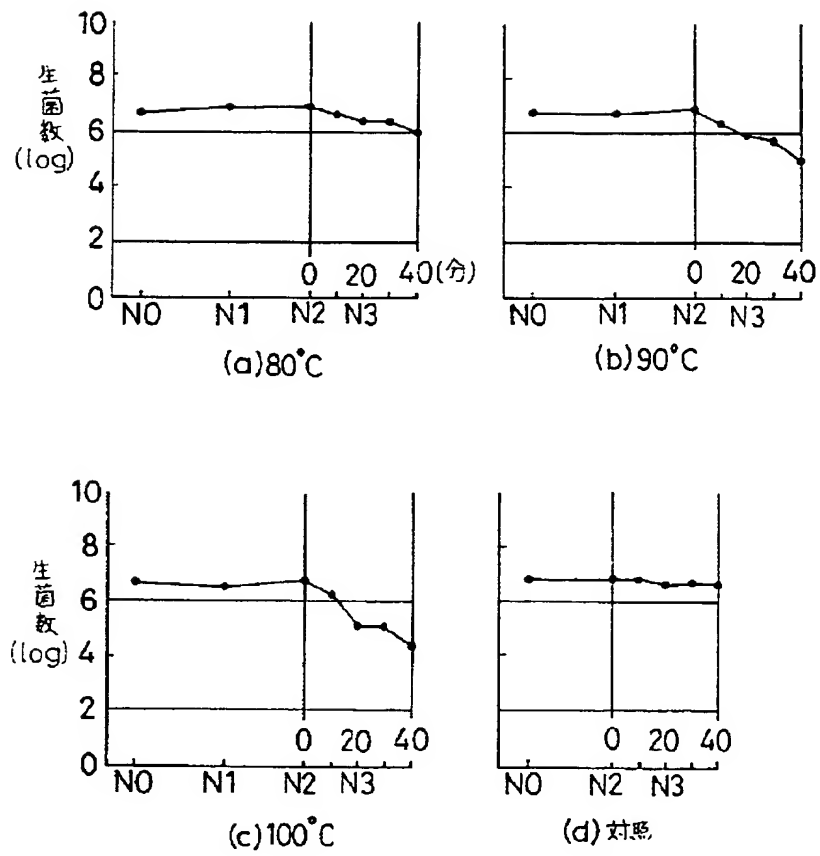
【図7】

B. subtilis ATCC 6633
[400MPa, Milk]



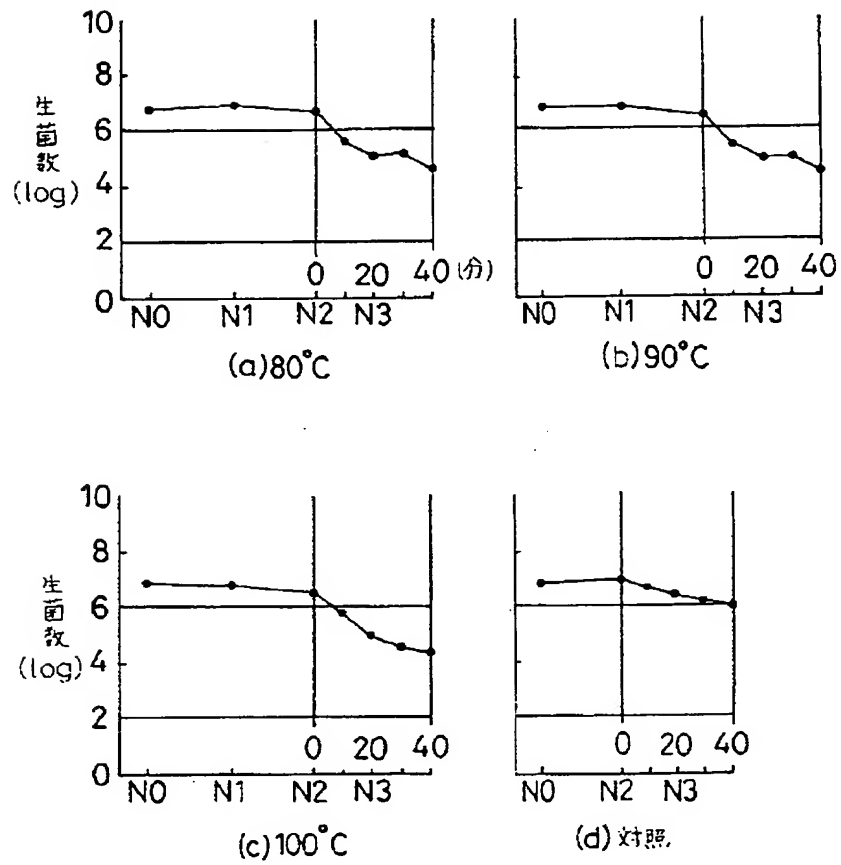
【図8】

B.subtilis NCDO2130
[400MPa, Buffer]



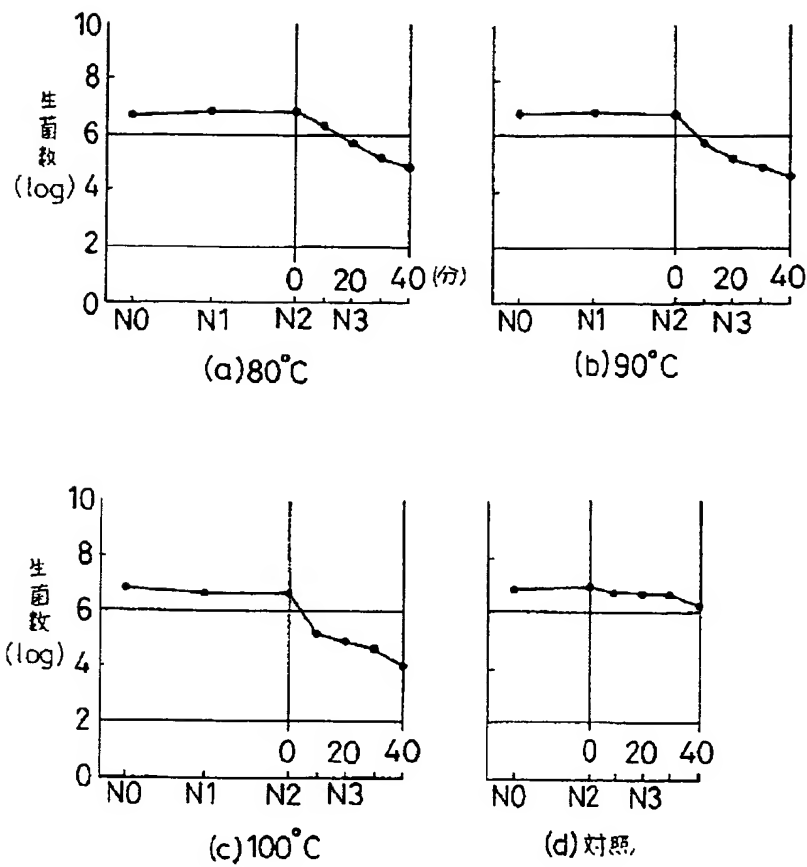
【図9】

B.subtilis NCDO 2130
[400MPa, Milk]



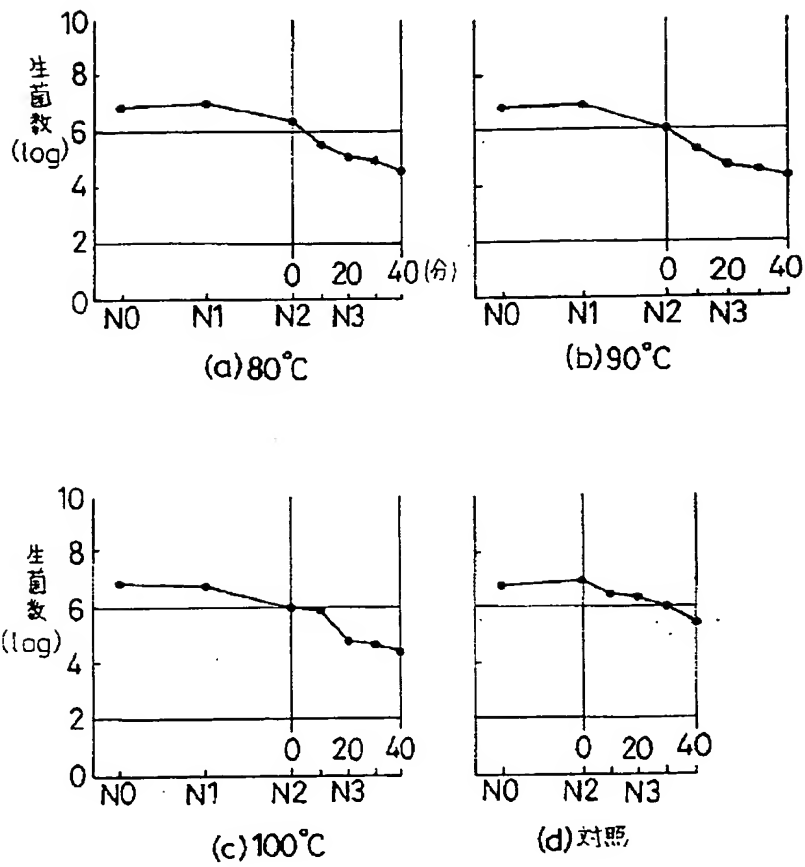
【図10】

B subtilis NCDO 2130
[600MPa, Buffer]



【図11】

B. Subtilis NCDO 2130
[600MPa, Milk]



THIS PAGE BLANK (USPTO)